

# 马尾松毛虫幼虫免疫系统对苏云金杆菌诱导的应答研究

钱 华 吴 蓉 柴希民

左小明 赵小立

(浙江省林业科学研究院, 杭州 310023)

(杭州大学生命科学院)

**摘 要** 报道了苏云金杆菌注射处理马尾松毛虫 5 龄幼虫后对血淋巴抗菌物质的诱导效果、诱导动力学、抗菌物质的活性、抗菌的种类。结果表明, 通过注射法可诱导马尾松毛虫幼虫产生抗菌物质, 其活力高峰出现在诱导后 42 h。诱导后 60 h 的血淋巴稀释 100 倍, 对苏云金杆菌的溶菌活力仍达  $1.42 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ 。其抗菌物质对苏云金杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌等均有抑菌作用。

**关键词** 马尾松毛虫; 幼虫; 血淋巴; 苏云金杆菌; 诱导; 抗菌物质; 生物防治

**中图分类号** S763.42; Q966

长期来, 对马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus*) 的综合治理方法包括化学防治和生物防治。生物防治所使用的生物制剂包括苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 和病毒等。近几年来对昆虫免疫机制的大量研究表明, 昆虫获得性免疫是非专一性的, 一些外源物质如细菌、理化因子等, 均能诱导昆虫产生抗菌物质, 这种反应不因外界的诱导源不同而改变<sup>[1-3]</sup>。由此可知, 生物制剂对昆虫抗菌物质也必然有诱导作用, 这将直接影响到生物防治的效果。因此, 对苏云金杆菌诱导马尾松毛虫幼虫血淋巴抗菌物质的研究不但可以揭示昆虫的抗病机理, 而且可以为生物防治中更合理有效地使用苏云金杆菌等生物制剂提供必要的实验依据。本文报道用注射苏云金杆菌处理马尾松毛虫 5 龄幼虫后, 其体内抗菌物质的产生规律及抗菌活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 马尾松毛虫采自浙江金华, 饲养方法参考文献[4]。

收稿日期: 1998-02-23; 修回日期: 1998-08-31

浙江省自然科学基金资助项目

第 1 作者简介: 钱华, 男, 1959 年生, 工程师

1.1.2 供试菌种 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、福氏痢疾杆菌 (*Flexneri s beillus*) 由浙江省卫生防疫站提供; 苏云金杆菌由浙江省微生物研究所提供。

## 1.2 方法

1.2.1 抗菌物质的诱导 将马尾松毛虫 5 龄幼虫置于冰上麻醉, 用微量注射器从幼虫腹部第 7 腹节或第 8 腹节处注入苏云金杆菌悬浮液  $1 \mu\text{L} \cdot \text{头}^{-1}$  (约含  $8 \times 10^3$  个孢子), 注射处用低熔点石蜡封闭。

1.2.2 血淋巴的提取 用昆虫针刺破供试昆虫的腹足, 用微量移液器吸取  $100 \mu\text{L}$  血淋巴于  $1 \text{ mL}$  的塑料离心管中, 置  $-30^\circ\text{C}$  低温冰箱保存待测。

### 1.2.3 抗菌活性测定

1.2.3.1 倍比稀释法 分别取  $3 \text{ mL}$  大肠杆菌的培养液 ( $\text{pH } 6.5$ ,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钾盐缓冲液, 含菌量为  $1 \times 10^9$  个), 加入  $10 \mu\text{L}$  经苏云金杆菌诱导  $60 \text{ h}$  的不同稀释浓度的幼虫血淋巴,  $37^\circ\text{C}$  水浴保温  $2 \text{ h}$  后取出, 置冰浴中冷却  $10 \text{ min}$  后测定菌液  $570 \text{ nm}$  的消光值 ( $A$ ) 的变化, 按 Hultmark 的方法<sup>[5]</sup> 计算溶菌活力 (表 1)。溶菌活力 =  $\frac{A_0 - A}{A_0} \times 16.67 \times 10^{-9}$  ( $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 其中  $A_0$  为对照在  $570 \text{ nm}$  处的光密度。

表 1 不同浓度血淋巴溶菌活力的测定

Table 1 Activities of lysozyme of haemolymph at different dilutions

血淋巴稀释倍数	对照 ( $A_0$ )	注射苏云金杆菌 ( $A$ )	溶菌活力 ( $\times 10^{-9}$ ) / $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$
1	0.250 3	0.127 9	8.15
10	0.237 9	0.141 4	6.76
20	0.250 3	0.149 3	6.73
40	0.238 6	0.161 4	5.39
80	0.238 6	0.200 0	2.70
100	0.242 8	0.222 1	1.42

1.2.3.2 平皿打孔法 分别以金黄色葡萄球菌、苏云金杆菌、大肠杆菌、福氏痢疾杆菌为指示菌, 取幼虫血淋巴  $50 \mu\text{L}$  加入含菌培养基上直径为  $2 \text{ mm}$  的孔中,  $37^\circ\text{C}$  下倒置培养过夜, 观察抑菌圈大小。

1.2.4 诱导时间测定 以注射苏云金杆菌法诱导抗菌物质, 并以其为指示菌, 分别取诱导后  $6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 \text{ h}$  的幼虫血淋巴作抑菌实验, 测其抑菌圈大小。

1.2.5 诱导强度测定 分别用含孢量为  $10^2 \sim 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的苏云金杆菌悬浮液注射松毛虫幼虫后诱导抗菌物质, 以大肠杆菌的指示菌作抑菌实验, 测其抑菌圈大小。

## 2 结果

### 2.1 抗菌活性测定

2.1.1 倍比稀释法 马尾松毛虫 5 龄幼虫经注射苏云金杆菌诱导后, 其血淋巴溶菌活力有很大提高, 但随稀释倍数的提高, 血淋巴的溶菌活力呈下降趋势 (表 1)。

2.1.2 平皿打孔法 经苏云金杆菌诱导的马尾松毛虫幼虫血淋巴对多种细菌均有抑菌作用,

抑菌圈大小见表 2。从表 2 可见, 抗菌物质对金黄色葡萄球菌所产生的抑菌圈较大, 对大肠杆菌和苏云金杆菌次之, 对福氏痢疾杆菌产生的抑菌圈较小。马尾松毛虫幼虫血淋巴抗菌物质虽有广谱性, 但对不同细菌所产生的抗菌效果还是具有一定的差别。

表 2 马尾松毛虫幼虫血淋巴对不同细菌抑菌活力的比较

Table 2 Antibacterial activity of haemolymph in the different bacteria

重复	抑菌圈直径/mm			
	金黄色葡萄球菌	苏云金杆菌	大肠杆菌	福氏痢疾杆菌
1	12.0	12.0	10.0	9.5
2	12.0	9.0	9.3	9.5
3	10.2	10.0	10.0	8.3
4	9.5	9.0	11.0	8.5
5	11.0	10.0	9.5	6.3
平均	10.9	10.0	9.9	8.4

## 2.2 抗菌物质的诱导高峰

经苏云金杆菌诱导后, 马尾松毛虫幼虫血淋巴中抗菌物质的活力从无到有, 并逐渐增高, 42 h 左右达到最高值, 以后呈逐渐下降的趋势, 结果见图 1。

## 2.3 诱导强度与诱导效果的关系

用不同浓度的苏云金杆菌对马尾松毛虫幼虫进行抗菌物质的诱导。结果表明, 诱导效果随诱导物浓度的增加而逐渐降低。当孢子浓度为  $10^2$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  时效果最好(图 2)。

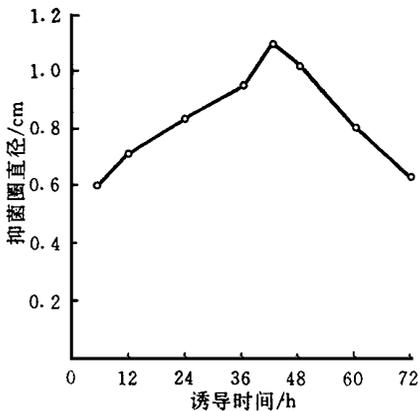


图 1 马尾松毛虫幼虫抗菌物质诱导活性与时间的动力学变化

Figure 1 Variation of antibacterial activities after induction

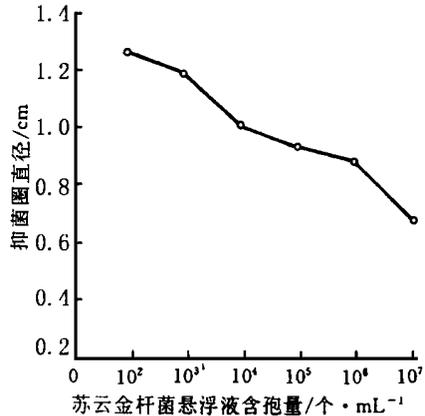


图 2 苏云金杆菌悬浮液含孢子量与诱导效果的关系

Figure 2 Relation between spore suspension concentration of *Bacillus thuringiensis* and inducing effect

### 3 讨论

在本实验中, 苏云金杆菌对马尾松毛虫幼虫血淋巴抗菌物质的诱导作用, 主要是通过注射方法直接进入昆虫体内, 而在实际使用时, 该菌制剂主要由昆虫经口食入并通过胃液分解后才起作用<sup>[6]</sup>。因此, 通过消化道进入昆虫体内的毒素对抗菌物质的诱导作用和诱导强度可能与直接注射不同, 这方面的研究还有待于进一步深入。

从本实验的结果可知, 苏云金杆菌既是杀虫剂又是诱导源, 能诱导昆虫产生抗菌物质, 并对苏云金杆菌及其他多种细菌具有抑制作用。这是由昆虫独特的免疫机制所决定的。我们知道, 苏云金杆菌产生对昆虫有致病力的毒素主要有  $\alpha$ -外毒素、 $\beta$ -外毒素、 $\delta$ -内毒素、 $\gamma$ -外毒素<sup>[7]</sup>。尽管已有试验表明, 昆虫血液中不存在能分解上述毒素的酶<sup>[6]</sup>, 但由于昆虫存在细胞免疫的功能, 能通过吞噬作用将体内异物摄入细胞内消化<sup>[8]</sup>。因此, 苏云金杆菌在诱导马尾松毛虫幼虫血淋巴产生抗菌物质的同时, 其血淋巴细胞的吞噬功能是否发生变化, 值得进一步研究。

了解昆虫血淋巴中抗菌物质在其他生物制剂诱导下的变化规律, 特别是在低剂量下的规律性, 有助于深入了解害虫对生物制剂抗菌性的产生与发展的机制, 从而探索更为有效、合理的生物防治措施。

### 参 考 文 献

- 1 张双全, 屈贤铭, 戚正武. 不同诱导源对柞蚕蛹血淋巴及生殖腺中抗菌物质产生的影响. 生物化学杂志, 1985, 1 (4): 49~54
- 2 黄自然, 王少颐. 注射大肠杆菌诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质. 华南农学院学报, 1981, 2 (1): 65~68
- 3 屈贤铭, 李士云, 吴克佐等. 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学. 昆虫学报, 1985, 28 (1): 1~7
- 4 朱鹏飞, 王荫长, 尤子平. 溴氰菊酯对马尾松毛虫幼虫血淋巴酯酶活性的影响效应. 林业科学研究, 1992, 5 (2): 188~192
- 5 Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T *et al.* Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*, *Eur J Biochem.* 1980, 106: 7~16
- 6 蒲蛰龙主编. 害虫生物防治的原理和方法. 第2版. 北京: 科学出版社, 1984. 98
- 7 张宗炳, 曹骥主编. 害虫防治: 策略与方法. 北京: 科学出版社, 1990. 377~381
- 8 王远程, 刘伟, 杨峰. 家蝇血淋巴的提取及抗菌物质的诱导. 微生物学报, 1992, 32 (6): 439~444

Qian Hua (Forestry Research Institute of Zhejiang, Hangzhou 310023, PRC), Wu Rong, Chai Ximin, Zuo Xiaoming, and Zhao Xiaoli. **Response on immune system of *Dendrolimus punctatus* larvae to induction of *Bacillus thuringiensis*.** *Journal of Zhejiang Forestry College*, 1998, 15 (4): 367~371

**Abstract:** Antibacterial matter was induced from 5 instar larvae of *Dendrolimus punctatus* by injecting *Bacillus thuringiensis* into their body. The kinetics, activity and specificity of antibacterial matter were reported. The results showed that injection was able to induce antibacterial matter from the larvae of

*Dendrolimus punctatus* and the activity peak value appeared at 42 h after treatment. After 60 h and at the dilution of 100 times, the activity of antibacterial matter in haemolymph is  $1.42 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$ . The antibacterial matter could also have restriction effect on the growth of *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Flexneris beaillus*.

**Key words:** *Dendrolimus punctatus*; larvae; haemolymph; *Bacillus thuringiensis*; induction; antibacterial matter; biotic control